

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. Juni 2005 (09.06.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/052173 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12P**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/053076

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. November 2004 (24.11.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 55 734.2 28. November 2003 (28.11.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): SYMRISE GMBH & CO. KG [DE/DE]; Mühlen-
feldstrasse 1, 37603 Holzminden (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RABENHORST, Jür-
gen [DE/DE]; Weserblick 13, 37671 Hötter (DE).

(74) Anwälte: SENDROWSKI, Heiko usw.; Eisenführ,
Speiser & Partner, Postfach 10 60 78, 28060 Bremen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts
- mit Angaben über hinterlegtes biologisches Material, ein-
gereicht gemäss Regel 13bis, getrennt von der Beschrei-
bung

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: FERMENTATION OF MONOVALENT SECONDARY ALCOHOLS IN ORDER TO FORM CORRESPONDING KE-
TONES

(54) Bezeichnung: FERMENTATION EINWERTIGER SEKUNDÄRER ALKOHOLE ZU ENTSPRECHENDEN KETONEN

(57) Abstract: The invention relates to a fermentation method which reacts a monovalent secondary alcohol with 5 or more carbon
atoms in order to form a corresponding ketone, namely. The invention also relates to micro-organisms suitable therefor.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Fermentationsverfahren zum Umsetzen eines einwertigen sekun-
dären Alkohols mit 5 oder mehr Kohlenstoffatomen zu dem entsprechenden Keton, dazu geeignete Mikroorganismen.



WO 2005/052173 A2

Symrise GmbH & Co. KG
Mühlenfeldstraße 1, 37603 Holzminden

Fermentation einwertiger sekundärer Alkohole zu entsprechenden Ketonen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Fermentationsverfahren zum Umsetzen eines einwertigen sekundären Alkohols mit 5 oder mehr Kohlenstoffatomen zu dem entsprechenden Keton, dazu geeignete Mikroorganismen und deren Enzyme. Von besonderem Interesse ist dabei die Herstellung aliphatischer Ketone aus den entsprechenden aliphatischen einwertigen sekundären Alkoholen, insbesondere die Herstellung von Pentan-2-on aus 2-Pentanol, Heptan-2-on aus 2-Heptanol, Octan-2-on aus 2-Octanol, Nonan-2-on aus 2-Nonanol, 1-Penten-3-on aus 1-Penten-3-ol, 1-Hexen-3-on aus 1-Hexen-3-ol, Hexan-3-on aus 3-Hexanol, Heptan-3-on aus 3-Heptanol und Octan-3-on aus 3-Octanol.

Aus der Literatur ist die Oxidation primärer Alkohole zu den entsprechenden Säuren bekannt, wie beispielsweise die Veröffentlichungen EP 289 822, DE 195 03 598, J. Chem. Tech. Biotechnol. 1997, 68, 214 – 218, und J. Chem. Tech. Biotechnol. 1997, 70, 294 - 298 belegen. In Lett. Appl. Microbiol. 1995,

20, 365 - 368 wird die Umsetzung von verschiedenen Alkoholen zu Säuren und zu 2-Butanon beschrieben und auf die stärker inhibierende Wirkung von 2-Butanon im Vergleich zu den Säuren hingewiesen. Zudem ist die asymmetrische Reduktion von Ketonen zur Herstellung von enantiomerenreinen Alkoholen mit *Gluconobacter oxydans* bekannt (Adlerkreuz, *Enzyme Microb. Technol.* 1991, 13, 9-14). Die Oxidation von sekundären Alkoholen ist mit Alkoholoxidasen aus verschiedenen Kohlenwasserstoff abbauenden Hefen bekannt (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992, 37, 66 - 73; *Tetrahedron Asymmetry* 2000, 11, 2367 - 2373). Diese Reaktion verläuft mit hoher Stereoselektivität, so dass nur maximal 50 Prozent des Substrats umgesetzt werden, was die mögliche Produktausbeute limitiert. Darüber hinaus wird NAD als Cofaktor benötigt. NAD muss daher entweder in equimolaren Mengen zugegeben werden, was aus wirtschaftlichen Gründen nicht möglich ist, oder mittels einer zweiten enzymatischen Umsetzung das entstandene NADH regeneriert werden, was ebenfalls mit Aufwand und Kosten verbunden ist. Schließlich beschreiben Adachi et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2003) 60:643-653, die Oxidation mehrwertiger Alkohole zu Molekülen mit gleichzeitig Hydroxy- und Ketofunktionen.

20 Die bisherigen Fermentationsverfahren erreichen oft nur unerwünscht niedrige Produktausbeuten. Enzymatische Verfahren, wie beispielsweise von Adlerkreuz (a.a.O.) beschrieben, erfordern zudem die Regeneration von zur Herstellung der Ketone notwendigen Coenzymen, was die Durchführung der enzymatischen Verfahren erschwert und verteuert.

25

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein Verfahren anzugeben, mit dessen Hilfe einwertige sekundäre Alkohole mit 5 oder mehr Kohlenstoffatomen in die entsprechenden Ketone umgesetzt werden können. Das Verfahren sollte möglichst einfach handhabbar sein, gute Produktausbeuten in geringer Reaktionszeit ermöglichen und kostengünstig durchführbar sein. Zudem sollen Mittel zum Durchführen dieser Verfahren angegeben werden. Insbesondere sollte das anzugebende Verfahren sowie die zu seiner

30

Durchführung geeigneten Mittel das Umsetzen eines aliphatischen einwertigen sekundären Alkohols zum entsprechenden Keton ermöglichen.

Es wird deshalb ein Verfahren zum Umsetzen eines einwertigen sekundären
5 Alkohols mit 5 oder mehr Kohlenstoffatomen zu dem entsprechenden Keton angegeben, wobei das Verfahren das Fermentieren des Alkohols zum Keton mit Hilfe eines Bakteriums der Gattung *Gluconobacter* und/oder *Acetobacter* in einem Fermentationsmedium umfasst.

10 Mit Hilfe dieses Verfahrens lassen sich die angestrebten Vorteile erreichen. Insbesondere gelingt das Umsetzen eines geradkettigen einwertigen sekundären Alkohols zum entsprechenden Keton leicht, in guter Ausbeute, reproduzierbar und kostengünstig. Zudem können gleichzeitig mehrere der einwertigen sekundären Alkohole zu den entsprechenden Ketonen fermentiert
15 werden.

Besonders vorteilhaft wirkt sich aus, das die Umsetzung des Alkohols zum Keton in einem Fermentationsverfahren, also unter Verwendung ganzer Zellen des zum Fermentieren verwendeten Bakteriums, durchgeführt wird. Beste
20 Ergebnisse konnten dabei erzielt werden, wenn das Fermentieren mit Hilfe eines vermehrungsfähigen Bakteriums der genannten Gattungen erfolgt. Dabei gilt ein Bakterium dann als vermehrungsfähig, wenn sich seine Zellzahl nach Überführen in ein übliches Kultivierungsmedium (z.B. DSM Medium 105: Glucose 100 g; Hefeextrakt 10 g; CaCO_3 20.0 g; destilliertes Wasser 1000 ml
25 eingestellt auf pH 6.8) und Kultivieren unter üblichen Kultivierungsbedingungen (z.B. 25 °C) innerhalb von 24 Stunden verdoppelt, wobei gegebenenfalls eine Mindest-Zellkonzentration zu Beginn des Kultivierens eingehalten werden muss. Als besonders vorteilhaft erweist sich dabei, dass auf die Regeneration von Coenzymen und Kofaktoren verzichtet werden kann, was die
30 Verfahrensdurchführung erheblich vereinfacht. In bevorzugten Ausführungsformen wird im erfindungsgemäßen Verfahren ein einwertiger sekundärer Alkohol mit 5 oder mehr Kohlenstoffatomen, höchstens jedoch 20 und besonders bevorzugt höchstens 14 Kohlenstoffatomen zu dem ent-

sprechenden Keton mit Hilfe eines Bakteriums der Gattung *Gluconobacter* und/oder *Acetobacter* fermentiert. Die nachfolgend angegebenen besonders bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung einschließlich der erfindungsgemäßen Stämme betreffen insbesondere auch das Fermentieren einwertiger sekundärer Alkohole mit den soeben angegebenen bevorzugten höchsten Anzahlen an Kohlenstoffatomen.

Vorzugsweise erfolgt die Fermentation eines einwertigen sekundären Alkohols mit 5 oder mehr Kohlenstoffatomen (vorzugsweise mit höchstens 20 Kohlenstoffatomen und besonders bevorzugt mit höchstens 14 Kohlenstoffatomen) mit Hilfe eines Bakteriums der Gattung *Gluconobacter*, wobei besonders gute Produktausbeuten vor allem bei Fermentationen mit Hilfe von Bakterien der Spezies *Gluconobacter oxydans* erreicht werden. Besonders gute Ergebnisse können erzielt werden, wenn das Fermentieren mit Hilfe eines Bakteriums des Stammes *Gluconobacter oxydans* ssp. *suboxydans* DSM 12884 bewirkt wird. Die Verwendung dieses Stammes zum Fermentieren eines einwertigen sekundären Alkohols, insbesondere eines aliphatischen und vorzugsweise geradkettigen Alkohols, mit 5 oder mehr Kohlenstoffatomen, bevorzugt höchstens 20 Kohlenstoffatomen und besonders bevorzugt höchstens 14 Kohlenstoffatomen, zum entsprechenden Keton ist daher besonders bevorzugt. Dieser Stamm ist in der Lage, mindestens 1 g/l 1-Penten-3-on innerhalb von 48 Stunden bei Fermentation in DSM-Medium 105 enthaltend 3 g/l 1-Penten-3-ol bei 25 °C zu fermentieren.

Zweckmäßigerweise wird das Fermentieren durchgeführt mit einer Reinkultur der genannten Bakterien, insbesondere von *Gluconobacter* sp. DSM 12884.

Als Nährmedium für die erfindungsgemäß eingesetzten Organismen kommen synthetische, halbsynthetische oder komplexe Medien in Betracht. Die Nährmedien können insbesondere als Fermentationsmedium verwendet werden und können kohlenstoffhaltige und stickstoffhaltige Verbindungen, anorganische Salze, gegebenenfalls Spurenelemente sowie Vitamine enthalten.

Als kohlenstoffhaltige Verbindungen können Kohlenhydrate, Kohlenwasserstoffe oder organische Grundchemikalien verwendet werden. Beispiele für vorzugsweise verwendbare Verbindungen sind Zucker, Alkohole bzw. Zuckeralkohole, organische Säuren oder komplexe Gemische. Ein
5 bevorzugter Zuckeralkohol ist Mannit.

Als organische Säuren können vorzugsweise Zitronensäure oder Essigsäure verwendet werden. Als Bestandteile halbsynthetischer oder komplexer Medien sind insbesondere Malzextrakt, Hefeextrakt, Casein oder Caseinhydrolysat
10 bevorzugt.

Als stickstoffhaltige Substrate können insbesondere anorganische Verbindungen verwendet werden, beispielsweise Nitrate und Ammoniumsalze. Ebenso können organische Stickstoffquellen verwendet werden wie Hefeextrakt,
15 Sojamehl, Baumwollsaatmehl, Weizengluten, Casein, Caseinhydrolysat und Maisquellwasser.

Zu den einsetzbaren anorganischen Salzen zählen beispielsweise Sulfate, Nitrate, Chloride, Carbonate und Phosphate. Als Metalle enthalten die
20 genannte Salze vorzugsweise Natrium, Kalium, Magnesium, Mangan, Calcium, Zink und/oder Eisen.

Bevorzugt ist es ferner, vor dem Fermentieren eine Kultur des zum Fermentieren verwendeten Bakteriums in einem Kultivierungsmedium vorzukultivieren, das Mannit, Malzextrakt, Hefeextrakt, Sojamehl, Baumwollsaatmehl,
25 Weizengluten, Casein, Caseinhydrolysat, Maisquellwasser, Zitronensäure, Essigsäure oder Mischungen zweier oder mehrerer dieser Bestandteile enthält und bei Beginn des Vorkultivierens einen pH-Wert von 4 bis 8 hat. Das Kultivieren erleichtert das Fermentieren insbesondere in dem Fall, in dem
30 Bakterien verwendet werden sollen, die sich vor Beginn des Fermentierens in einem Ruhezustand befinden, insbesondere in einer Glycerinkultur. Es ist ebenfalls möglich, zunächst in einem Kultivierungsmedium die zum Fermentieren verwendeten Bakterien vorzukultivieren und nach dem Vorkultivieren zu

diesem Medium den oder die zu fermentierenden Alkohol(e) hinzuzufügen. Besonders bewährt als Kultivierungsmedium hat sich ein Medium bestehend aus 1-2 g D-Mannit und 1-2 g Hefeextrakt, bezogen auf 100 ml Medium, bei einem pH-Wert von 5-6.

5

Die Temperatur für das Fermentieren und das Kultivieren liegt vorzugsweise im Bereich von 10 bis 40 °C. Besonders bevorzugt ist der Bereich von 20 bis 35 °C, höchst bevorzugt sind 25 bis 27 °C, da bei diesen Temperaturen besonders gute Umsätze und Produktausbeuten erzielt werden konnten.

10

Der pH-Wert des Fermentations- und des Kultivierungsmediums beträgt zu Beginn des Fermentierens bzw. zu Beginn des Kultivierens bevorzugt 4 bis 8, wobei der Bereich von 4,8 bis 6,3 besonders bevorzugt ist.

15

Besonders gute Fermentationsergebnisse konnten erhalten werden, wenn zum Zeitpunkt der Substratzugabe die optische Dichte der Kultur bei mindestens OD₆₀₀ 2,0, die Lebendkeimzahl mindestens 1×10^8 /ml und die Konzentration gelösten Sauerstoffs im Fermentationsmedium vor der Substratzugabe nicht mehr als 10 % beträgt.

20

Grundsätzlich können für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens alle dem Fachmann bekannten Bioreaktoren eingesetzt werden. Vorzugsweise wird ein zur Durchführung von Submersverfahren geeigneter Bioreaktor zum Fermentieren verwendet. Das heißt, es können erfindungsgemäß Bioreaktoren ohne oder mit mechanischer Mischeinrichtung eingesetzt werden. Zu ersteren zählen z.B. Schüttelapparaturen, Blasensäulen- oder Schlaufenreaktoren. Zu letzteren gehören Bioreaktoren mit Rührern in beliebiger Gestaltung.

25
30

Das erfindungsgemäße Verfahren kann kontinuierlich oder diskontinuierlich durchgeführt werden. Die Dauer der Fermentation bis zum Erreichen einer maximalen Produktmenge hängt von der speziellen Art des eingesetzten Organismus ab. Besonders gute Produktausbeuten konnten bei einer

Fermentation von 2 bis zu 200 Stunden erreicht werden, wobei die Fermentation vorzugsweise 8 bis 78 Stunden lang durchgeführt wird.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können insbesondere folgende
5 Ketone hergestellt werden: Pentan-2-on, Heptan-2-on, Octan-2-on, Nonan-2-on, 1-Penten-3-on, 1-Hexen-3-on, Hexan-3-on, Heptan-3-on und Octan-3-on.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert, wobei die Beispiele nicht als den Gegenstand der Erfindung einschränkend zu
10 verstehen sind:

Beispiel 1 - Herstellen der Vorkultur

Ein 500 ml Erlenmeyerkolben mit seitlichem Einstich mit 100 ml sterilem
15 Kulturmedium, bestehend aus 1,25 g D-Mannit und 1,25 g Hefeextrakt bei pH 5,6, wird mit 0,9 ml einer Glycerinkultur von Gluconobacter sp. DSM 12884 angeimpft. Der Kolben wird 16 Stunden lang auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 25 °C und 100 Upm inkubiert.

20 Beispiel 2 - Herstellung von natürlichem 1-Penten-3-on aus 1-Penten-3-ol

Es werden 125 g Mannit und 125 g Hefeextrakt in 9,9 L Wasser in einem 10 l Fermenter gelöst, 10 ml Antischaummittel hinzu gegeben und der pH-Wert auf 6,3 eingestellt. Das so hergestellte Fermentationsmedium wird 30 Minuten lang
25 bei 121 °C sterilisiert. Nach dem Abkühlen auf 25 °C wird der Fermenter mit der Vorkultur aus Beispiel 1 angeimpft.

Während der Umsetzung von 1-Penten-3-ol und einer dieser voraufgehenden Wachstumsphase wird das Fermentationsmedium gerührt. Die Drehzahl des
30 Rührers beträgt 500 Upm, die Zuluft 5 NL/min; die Temperatur 25 °C. Nach Einstellen dieser Parameter wird das Fermentationsmedium mit der 100 ml Vorkultur gemäß Beispiel 1 angeimpft.

Nach ca. 23 Stunden Kultivierungszeit (Wachstumsphase) wird das Substrat 1-Penten-3-ol (150 ml) über einen Trichter dem Fermenter zugeführt und die Fermentation begonnen. Zeitgleich wird die Zuluft von 5 NL/min auf 1 NL/min ($\pm 0,1$ vvm) gedrosselt. Der pH-Wert bleibt während der Kultivierungszeit und
5 der Fermentation relativ stabil.

Da sowohl das Substrat 1-Penten-3-ol als auch das Produkt 1-Penten-3-on sehr leicht flüchtig sind, wird die Abluft des Fermenters über einen Aktivkühler geleitet und anschließend in einer Kühlfalle aufgefangen, die mit einem
10 Isopropanol-Trockeneis-Gemisch gekühlt wird.

Die Fermentation wird nach ca. 70 Stunden beendet. Die Endkonzentration des 1-Penten-3-ons beträgt im Fermentationsmedium laut HPLC ca. 5 g/l. Das Substrat 1-Penten-3-ol liegt noch in einer Konzentration von etwa 2 g/l im
15 Fermentationsmedium vor. In der Kühlfalle befinden sich am Ende des Prozesses ca. 20 g 1-Penten-3-on.

Beispiel 3 - Gewinnung von 2-Pentanon aus 2-Pentanol

20 Zwei 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schliff mit je 20 ml sterilem Kultivierungsmedium, bestehend aus 0,25 g D-Mannit und 0,25 g Hefeextrakt bei pH 5,6, werden mit 200 μ l einer Vorkultur von Gluconobacter sp. DSM 12884 angeimpft.

25 Die Kolben werden 20 Stunden lang auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 25 °C und 100 Upm inkubiert. Während dieser Wachstumsphase sind die Kolben mit Wattestopfen steril verschlossen.

Anschließend wird den Kolben je 200 μ l 2-Pentanol zugegeben, die Kolben
30 werden mit sterilen Schliffstopfen verschlossen und weiter inkubiert. 24 und 48 Stunden nach Zugabe des 2-Pentanol wird je 1 ml Probe entnommen, mit 2 ml Hexan extrahiert und gaschromatographisch analysiert. Nach 24 Stunden

wurden 83 % (Flächenprozent) 2-Pentanon und 10,5 % 2-Pentanol gefunden. Nach 48 Stunden liegt der Gehalt an 2-Pentanon bei über 92 %.

Beispiel 4 - Gewinnung von 2-Heptanon aus 2-Heptanol

5

Zwei 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schliff mit je 20 ml sterilem Kultivierungsmedium, bestehend aus 0,25 g D-Mannit und 0,25 g Hefeextrakt bei pH 5,6, werden mit 200 µl einer Vorkultur von *Gluconobacter* sp. DSM 12884 angeimpft.

10

Die Kolben werden 20 Stunden lang auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 25 °C und 100 Upm inkubiert. Während dieser Wachstumsphase sind die Kolben mit Wattestopfen steril verschlossen.

- 15 Anschließend wird den Kolben je 100 µl 2-Heptanol zugegeben, die Kolben mit sterilen Schliffstopfen verschlossen und weiter inkubiert. 24 und 48 Stunden nach Zugabe des 2-Heptanol wird je 1 ml Probe entnommen, mit 2 ml Hexan extrahiert und gaschromatographisch analysiert. Nach 24 Stunden wurden 54,7 % (Flächenprozent) 2-Heptanon und 35 % 2-Heptanol gefunden.
- 20 Nach 48 Stunden liegt der Gehalt an 2-Heptanon bei über 59 %, während noch 31,9 % 2-Heptanol vorliegen.

Beispiel 5 - Gewinnung von 2-Octanon aus 2-Octanol

- 25 Zwei 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schliff mit je 20 ml sterilem Kultivierungsmedium, bestehend aus 0,25 g D-Mannit und 0,25 g Hefeextrakt bei pH 5,6, werden mit 200 µl einer Vorkultur von *Gluconobacter* sp. DSM 12884 angeimpft.

- 30 Die Kolben werden 20 Stunden lang auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 25 °C und 100 Upm inkubiert. Während dieser Wachstumsphase sind die Kolben mit Wattestopfen steril verschlossen.

Anschließend wird den Kolben je 100 µl 2-Octanol zugegeben, die Kolben mit sterilen Schliffstopfen verschlossen und weiter inkubiert. 24 Stunden nach Zugabe des 2-Octanol wird je 1 ml Probe entnommen, mit 2 ml Hexan extrahiert und gaschromatographisch analysiert. Es wurden 37,2 %
5 (Flächenprozent) 2-Octanon und 46,1 % 2-Octanol gefunden.

Beispiel 6 - Gewinnung von 2-Nonanon aus 2-Nonanol

10 Zwei 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schliff mit je 20 ml sterilem Kultivierungsmedium, bestehend aus 0,25 g D-Mannit und 0,25 g Hefeextrakt bei pH 5,6, werden mit 200µl einer Vorkultur von Gluconobacter sp. DSM 12884 angeimpft.

Die Kolben werden 20 Stunden lang auf einer rotierenden Schüttelmaschine
15 bei 25 °C und 100 Upm inkubiert. Während dieser Wachstumsphase sind die Kolben mit Wattestopfen steril verschlossen.

Anschließend wird den Kolben je 100 µl 2-Nonanol zugegeben, die Kolben mit sterilen Schliffstopfen verschlossen und weiter inkubiert. 48 Stunden nach
20 Zugabe des 2-Nonanol wird je 1 ml Probe entnommen, mit 2 ml Hexan extrahiert und gaschromatographisch analysiert. Es wurden 32 % (Flächenprozent) 2-Nonanon und 48,8 % 2-Nonanol gefunden.

Beispiel 7 - Gewinnung von 3-Octanon aus 3-Octanol

25 Zwei 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schliff mit je 20 ml sterilem Kultivierungsmedium, bestehend aus 0,25 g D-Mannit und 0,25 g Hefeextrakt bei pH 5,6, werden mit 200µl einer Vorkultur von Gluconobacter sp. DSM 12884 angeimpft.

30 Die Kolben werden für 20 Stunden auf der rotierenden Schüttelmaschine bei 25 °C und 100 Upm inkubiert. Während dieser Wachstumsphase sind die Kolben mit Wattestopfen steril verschlossen.

Anschließend wird den Kolben je 100 µl 3-Octanol zugegeben, die Kolben mit sterilen Schliffstopfen verschlossen und weiter inkubiert. 72 Stunden nach Zugabe des 3-Octanol wird je 1 ml Probe entnommen, mit 2 ml Hexan
5 extrahiert und gaschromatographisch analysiert. Nach 72 Stunden wurden 4,4 % (Flächenprozent) 3-Octanon und 81,5 % 3-Octanol gefunden.

Beispiel 8 - Gewinnung von 3-Hexanon aus 3-Hexanol

10 Zwei 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schliff mit je 20 ml sterilem Kultivierungsmedium, bestehend aus 0,25 g D-Mannit und 0,25 g Hefeextrakt bei pH 5,6, werden mit 200µl einer Vorkultur von Gluconobacter sp. DSM 12884 angeimpft.

15 Die Kolben werden 20 Stunden lang auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 25 °C und 100 Upm inkubiert. Während dieser Wachstumsphase sind die Kolben mit Wattestopfen steril verschlossen.

Anschließend wird den Kolben je 200 µl 3-Hexanol zugegeben, die Kolben mit
20 sterilen Schliffstopfen verschlossen und weiter inkubiert. 24 und 54 Stunden nach Zugabe des 3-Hexanol wird je 1 ml Probe entnommen, mit 2 ml Hexan extrahiert und gaschromatographisch analysiert. Nach 24 Stunden wurden 70,7 % (Flächenprozent) 3-Hexanon und 24,5 % 3-Hexanol gefunden. Nach 54 Stunden liegt der Gehalt an 3-Hexanon bei über 88 %, während von dem
25 Substrat nur noch 7,4 % vorhanden sind.

Beispiel 9 - Gewinnung von 1-Hexen-3-on aus 1-Hexen-3-ol

Zwei 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schliff mit je 20 ml sterilem Kultivierungs-
30 medium, bestehend aus 0,25 g D-Mannit und 0,25 g Hefeextrakt bei pH 5,6, werden mit 200µl einer Vorkultur von Gluconobacter sp. DSM 12884 angeimpft.

Die Kolben werden 20 Stunden lang auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 25 °C und 100 Upm inkubiert. Während dieser Wachstumsphase sind die Kolben mit Wattestopfen steril verschlossen.

- 5 Anschließend wird den Kolben je 200 µl 1-Hexen-3-ol zugegeben, die Kolben mit sterilen Schliffstopfen verschlossen und weiter inkubiert. 8 Stunden nach Zugabe des 2-Hexen-2-ol wird je 1 ml Probe entnommen, mit 2 ml Hexan extrahiert und gaschromatographisch analysiert. Es wurden 25,4 % (Flächenprozent) 1-Hexen-3-on und 69,7 % 1-Hexen-3-ol gefunden.

10

Beispiel 10 - Gewinnung von 3-Heptanon aus 3-Heptanol

- 15 Zwei 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schliff mit je 20 ml sterilem Kultivierungsmedium, bestehend aus 0,25 g D-Mannit und 0,25 g Hefeextrakt bei pH 5,6, werden mit 200µl einer Vorkultur von Gluconobacter sp. DSM 12884 angeimpft.

- 20 Die Kolben werden 20 Stunden lang auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 25 °C und 100 Upm inkubiert. Während dieser Wachstumsphase sind die Kolben mit Wattestopfen steril verschlossen.

- 25 Anschließend wird den Kolben je 200 µl 3-Heptanol zugegeben, die Kolben mit sterilen Schliffstopfen verschlossen und weiter inkubiert. 8 Stunden nach Zugabe des 3-Heptanol wird je 1 ml Probe entnommen, mit 2 ml Hexan extrahiert und gaschromatographisch analysiert. Es wurden 2,3 % (Flächenprozent) 3-Heptanon und 92,2 % 3-Heptanol gefunden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Umsetzen eines einwertigen sekundären Alkohols mit 5
5 oder mehr Kohlenstoffatomen zu dem entsprechenden Keton, umfassend die
Oxidation des Alkohols zum Keton mit Hilfe eines Bakteriums der Gattung
Gluconobacter und/oder Acetobacter in einem Fermentationsmedium.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die
10 Oxidation mit Hilfe eines Bakteriums der Gattung Gluconobacter bewirkt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die
Umsetzung mit Hilfe eines Bakteriums des Stammes Gluconobacter sp. DSM
12884 bewirkt wird.
15
4. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Fermentationsmedium Mannit, Malzextrakt, Hefeextrakt,
Sojamehl, Baumwollsaatmehl, Weizengluten, Casein, Caseinhydrolysat,
Maisquellwasser, Zitronensäure, Essigsäure oder Mischungen oder mehrerer
20 dieser Bestandteile enthält und bei Beginn des Fermentierens einen pH-Wert
von 4 bis 8 hat.
5. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das zum Fermentieren verwendete Bakterium vor dem
25 Fermentieren in einem Kultivierungsmedium vorkultiviert wird, das Mannit,
Malzextrakt, Hefeextrakt, Sojamehl, Baumwollsaatmehl, Weizengluten,
Casein, Caseinhydrolysat, Maisquellwasser, Zitronensäure, Essigsäure oder
Mischungen zweier oder mehrerer dieser Bestandteile enthält und bei Beginn
des Vorkultivierens einen pH-Wert von 4 bis 8 hat.
30
6. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Fermentieren bei einer Temperatur von 20 bis 40 °C
erfolgt.

7. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Gelöstsauerstoffkonzentration im Fermentationsmedium kleiner oder gleich 5 % ist.
- 5 8. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass in der Fermentation 2-Pentanol zu Pentan-2-on, 2-Heptanol zu Heptan-2-on, 2-Octanol zu Octan-2-on, 2-Nonanol zu Nonan-2-on, 1-Penten-3-ol zu 1-Penten-3-on, 1-Hexen-3-ol zu 1-Hexen-3-on, 3-Hexanol zu Hexan-3-on, 3-Heptanol zu Heptan-3-on und/oder 3-Octanol zu Octan-3-on umgesetzt
10 wird.
9. *Gluconobacter* sp. DSM 12884.
10. Verwendung von *Gluconobacter* sp. DSM 12884 zum Fermentieren
15 eines einwertigen sekundären Alkohols mit 5 oder mehr Kohlenstoffatomen zum entsprechenden Keton.

0-1	Formular PCT/RO/134 (SAFE) Angaben zu einem hinterlegten Mikroorganismus und/oder anderem hinterlegten biologischen Material erstellt mit	
0-1-1		
0-2	Internationales Aktenzeichen	PCT/EP2004/053076
0-3	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	HA 3871-02WO

1	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/ oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
1-1	absatz zahl	Seiten 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12
1-3	Angaben betr. Hinterlegung	
1-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor- ganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Datum der Hinterlegung	17. Juni 1999 (17.06.1999)
1-3-4	Eingangsnummer	DSMZ 12884
1-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten

VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

0-4	Dieses Formular ist mit der interna- tionalen Anmeldung eingegangen (ja oder nein)	
0-4-1	Bevollmächtigter Bediensteter	

VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

0-5	Dieses Formular ist an folgendem Datum beim internationalen Büro eingegangen	
0-5-1	Bevollmächtigter Bediensteter	

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: AR 101	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 12884
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>() eine wissenschaftliche Beschreibung</p> <p>(X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
<p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1999-06-17 (Datum der Erst hinterlegung)¹ eingegangen ist.</p>	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
<p>Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Erst hinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Weisk</i></p> <p>Datum: 1999-06-21</p>

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.